

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3644346 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 36 44 346.8
㉔ Anmeldetag: 19. 12. 86
㉕ Offenlegungstag: 21. 5. 87

㉙ Int. Cl. 4:
B 01 J 20/26
C 07 H 21/02
C 07 H 21/00
B 01 J 20/30
B 01 D 15/08

Behördeneigentlich

DE 3644346 A1

Mit Einverständnis des Anmelders offengelegte Anmeldung gemäß § 31 Abs. 2 Ziffer 1 PatG

㉙ Anmelder:

Säulentechnik Dr.-Ing. Herbert Knauer GmbH, 1000
Berlin, DE

㉚ Erfinder:

Klussmann, Udo, Dr.; Erdmann, Volker A., Prof. Dr.,
1000 Berlin, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉛ **Matrixgebundene Kronenetherliganden als Trennmaterial in der Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren**

Kronenether oder Kryptanden werden covalent an ein in der Chromatographie gebräuchliches Trägerpolymeres gebunden. Auf diese Weise erhält man ein chromatographisches Trennmaterial, das in der Lage ist, in Gegenwart von Alkalimetallionen Nukleinsäuren und Oligonukleotide reversibel zu binden. Das Trennmaterial eignet sich hervorragend für die Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren, die Abtrennung von Nukleinsäuren aus biologischen Proben und die Trennung von Nukleinsäure- und Oligonukleotid Gemischen sowohl im analytischen als auch im präparativen Maßstab. Bei der Anwendung geeigneter Trägerpolymere ist der Einsatz des neuartigen Trennmaterials in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie problemlos möglich

DE 3644346 A1

Patentansprüche

1. Trennmateriel zur Affinitätschromatographie, bestehend aus Kronenetherliganden, die covalent an ein polymeres Trägermaterial gebunden sind.
2. Trennmateriel gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet daß als polymere Trägermaterialien Eupergit® C (Röhm) oder Epoxyaktivierte Sepharose 6B® (Pharmacia) oder LiChrospher® (Merck) oder Fractogel® TSK AF-Epoxy 650 (Merck) oder Epoxypropyl = SP500® (Serva) oder epoxyaktiviertes Kieselgel Si200® bzw. Si300®, Si500® und Si1000® (Serva) oder andere Trägermaterialien, die sich zu Epoxiden, Aldehyden, Tresylaten, Tosylaten, Mercaptanen und Hydroxysuccinimiden derivatisieren lassen, verwendet werden.
3. Trennmateriel gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als polymeres Trägermaterial ein aktiviertes, zur covalenten Bindung an Amino- oder Hydroxylgruppen befähigtes Polymeres aus dem organischen oder anorganischen Bereich verwendet wird.
4. Trennmateriel gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kronenether Monoaza-15-Krone-5, Monoaza-18-Krone-6, 1,10-Diaza-18-Krone-6, Tetraaza-12-Krone-4, Monoaminodicyclohexyl-18-Krone-6, Monoaminodibenzo-18-Krone-6, Hydroxymethyl-15-Krone-5, Hydroxymethyl-18-Krone-6, 4-Hydroxymethylbenzo-15-Krone-5, 4-Hydroxymethylbenzo-18-Krone-6 oder Hydroxymethylkryptand[2,2,2] covalent an die polymere Matrix gebunden sind.
5. Verfahren zur Herstellung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die covalente Anbindung des Kronenetherliganden über einen Spacer der allgemeinen Formel:

$$H_2N-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_n-CH_2-NH_2$$
mit $n = 1, 2, \dots, 10$ erfolgt.
6. Verfahren zur Herstellung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie gemäß Patentanspruch 1 – 5, dadurch gekennzeichnet, daß pro g Trägermaterial 0,1 – 10 mMol Kronenetherliganden covalent gebunden sind.
7. Verwendung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie gemäß Patentanspruch 1 – 6, dadurch gekennzeichnet, daß es in wässrigem Medium zur reversiblen Bindung von Nukleinsäuren und Oligonukleotide angewendet wird.
8. Verwendung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie gemäß Patentanspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäuren und Oligonukleotide in einer Lösung enthaltend 50mM KCl und 5mM Tris.HCl-Puffer pH = 7,6 (Bindungspuffer) an das Trennmateriel gebunden werden.
9. Verwendung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren gemäß Patentanspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die unter Bedingungen des Bindungspuffers gebundenen Nukleinsäuren und Oligonukleotide durch Elution mit einer Lösung höherer Salzkonzentration wie z. B. 1M NaCl oder 2M Ammoniumacetat (Elutionspuffer) wieder von dem Trennmateriel abgelöst werden können.
10. Verwendung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren gemäß Patentanspruch 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer offenen Chromatographiesäule erfolgt.
11. Verwendung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren gemäß Patentanspruch 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer geschlossenen Chromatographiesäule unter Druck erfolgt.
12. Verwendung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren gemäß Patentanspruch 8 – 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution der Nukleinsäuren bzw. Oligonukleotide durch einen Puffergradienten hervorgerufen wird, bei dem der Bindungspuffer sukzessive durch den Elutionspuffer ersetzt wird.
13. Verwendung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren gemäß Patentanspruch 8 – 12, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Isolierung von Ribonukleinsäuren aus Ribosomen von Eukaryonten, Prokaryonten, Organellen und Endosymbionten angewandt wird.
14. Verwendung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren gemäß Patentanspruch 8 – 12, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Abtrennung von ribosomaler RNS von ribosomalen Proteinen angewandt wird.
15. Verwendung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren gemäß Patentanspruch 8 – 12, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Trennung eines Gemisches aus Nukleinsäuren Oligonukleotiden und Desoxyoligonukleotiden angewandt wird.
16. Verwendung von Trennmateriel zur Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren gemäß Patentanspruch 8 – 12, dadurch gekennzeichnet daß es zur Reinigung und Entsalzung von Oligonukleotiden, Plasmiden und Restriktionsfragmenten angewandt wird.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft das in den Patentansprüchen gekennzeichnete Trennmateriel zur Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren, ein Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung zur Isolierung, Reinigung und Trennung von Nukleinsäuren und Oligonukleotiden.

In der Biochemie und Molekularbiologie gehören die Isolierung von Nukleinsäuren aus den Ribosomen und deren Reinigung von anderen Zellbestandteilen zu den häufig angewandten Arbeitsmethoden. So bestehen z. B. die Ribosomen des Bakteriums *Escherichia coli* aus einer großen (50 S) Untereinheit mit zwei Nukleinsäuren

(23S rRNS und 5S rRNS) und 34 Proteinen sowie aus einer kleinen (30 S) Untereinheit mit einer Nukleinsäure (16 S RNS) und 21 Proteinen. Zwischen den ribosomalen Proteinen und Nukleinsäuren bestehen bindende Wechselwirkungen, so daß eine Trennung nur unter extremen Bedingungen (2M LiCl, 4M Harnstoff) erfolgen kann. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen matrixgebundenen Kronenetherliganden kann aus Ribosomen von Eukaryonten, Prokaryonten, Organellen und Endosymbionten die Ribonukleinsäuren von den ribosomalen Proteinen abgetrennt und isoliert werden. Das Trennmateriale eignet sich ebenfalls dazu, um auch andere RNA-Spezies sowie DNA-Moleküle von Proteingemischen abzutrennen. Weiterhin kann das Trennmateriale dazu benutzt werden, ein Nukleinsäuregemisch oder ein Gemisch aus Nukleinsäurefragmenten oder DNS- oder RNS-Oligonukleotiden durch eine Elution mit einem Salzgradienten in die einzelnen Komponenten aufzutrennen. Gegenüber den herkömmlichen Verfahren zeichnen sich die erfindungsgemäßen matrixgebundenen Kronenetherliganden durch eine einfachere und schnellere Arbeitsweise aus. Darüber hinaus ist das Trennmateriale äußerst stabil, autoklavierbar und praktisch unbegrenzt einsetzbar. Seine kostengünstige Produktion im großen Maßstab bereitet keine Schwierigkeiten.

Wechselwirkungen zwischen Kronenethern und Nukleotiden sind bereits in der Literatur beschrieben. So wurde festgestellt, daß Polyadenylat in Gegenwart von K^+ -Ionen mit dem wasserlöslichen Poly(vinylbenzo-18-Krone-6) einen unlöslichen Komplex bildet (J. Pitha und J. Smid, *Biochim. Biophys. Acta* 425 (1976) 287–95). Weiterhin wurden Kronenether dazu benutzt, DNS selektiv in unpolaren Lösungsmitteln löslich zu machen (B. Odell, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1985) 858–9 und B. Odell, *Eur. Pat. Appl. EP 1 56 414 A2*, 2.10.1985).

Kronenether sind bekannt dafür, daß sie Alkalimetallkationen zu komplexieren vermögen [C.J. Pedersen, *Fed. Proc. Am Soc. Exp. Biol.* 27 (1968) 1305–9 sowie S. Kopolow et al. *Macromolecules* 6 (1973) 133–42].

In der hier vorgestellten Erfindung werden Kronenether covalent an ein polymeres Trägermaterial fixiert. In Gegenwart einer wässrigen Lösung, die Kaliumionen mit einer Konzentration von 50 mM/l enthält, werden Nukleinsäuren und Oligonukleotide selektiv und reversibel an die Kronenetherliganden gebunden. Es kann angenommen werden, daß die Kronenether durch die komplexierten Alkalimetallionen in Polykationen umgewandelt werden, die dann mit den Phosphat-Anionen der Nukleotid-Bausteine in eine elektrostatische Wechselwirkung treten können. Bei einer Erhöhung der Salzkonzentration, z. B. durch Anlegen eines Salzgradienten, verdrängen die im Überschuß zugefügten Gegenionen die Phosphat-Ionen, so daß die Nukleinsäuren und Oligonukleotide wieder freigesetzt werden. Da die Wechselwirkung mit den Kronenetherliganden von der Größe und der Tertiärstruktur der Biomoleküle abhängt, kann das hier beschriebene Verfahren zur Trennung eines Nukleinsäuregemisches herangezogen werden.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen matrixgebundenen Kronenetherliganden erfolgt in der Weise, daß ein Kronenether auf der Basis von 18-Krone-6, 15-Krone-5, Benzo-18-Krone-6, Dibenzo-18-Krone-6, Dicyclohexyl-18-Krone-6 oder Kryptand [2.2.2] als Hydroxyl-, Aza- oder Aminoderivat covalent an ein handelsübliches, in der Chromatographie gebräuchliches Trägerpolymeres gebunden wird. Die Bindung erfolgt über Epoxidgruppen, die entweder bereits am Trägermaterial vorhanden sind, oder durch nachträgliche Derivatisierung eingefügt werden. Es kommen dafür z. B. makroporöse Copolymerisate aus Methacrylamid, NN-Methylenbisacrylamid und Monomeren mit Oxirangruppen wie Eupergit® C (Röhm GmbH) oder Epoxy-aktivierte Sepharose® 6B (Pharmacia) oder Epoxyderivate verschiedener Silicagele wie Fraktogel® oder LiChrospher® (Merck) in Frage. Dabei hat es sich als günstig erwiesen, zwischen den polymeren Träger und den Kronenetherliganden ein geeignetes Diamin wie z. B. 1,8 Diamino-3,6-dioxaoctan als einen Spacer einzufügen.

Ebenfalls geeignet als Trägermaterialien sind Polymere aus dem organischen und anorganischen Bereich, die als reaktive Gruppen Aldehyd-, Tresyl-, Tosyl-, Mercapto-, oder Hydroxysuccinimid-Gruppen tragen, wobei derartige Gruppen auch durch nachträgliche Derivatisierung handelsüblicher Polymerer entstanden sein können.

Die erfindungsgemäßen matrixgebundenen Kronenetherliganden werden üblicherweise in eine Chromatographiesäule gefüllt und in dieser Form zur Affinitätschromatographie von Nukleinsäuren eingesetzt. Je nach der Druckstabilität des verwendeten Trägermaterials sind sowohl Niederdruck- als auch Hochdruckflüssigkeitschromatographie möglich.

Das zu trennende, Nukleinsäuren enthaltende Stoffgemisch wird in einer Lösung enthaltend 50mM KCl und 5mM Tris.HCl Puffer, pH = 7,6 (Bindungspuffer) auf die Säule gegeben, wobei eine selektive Bindung der Nukleinsäuremoleküle an die Kronenetherliganden erfolgt, andere Bestandteile, wie z. B. Proteine jedoch durchlaufen.

Die Elution der gebundenen Nukleinsäuren erfolgt mit einer Lösung, die 1M NaCl und 5mM Tris.HCl, pH = 7,6 (Elutionspuffer) enthält. Statt NaCl lassen sich auch KCl, LiCl oder NH_4Cl verwenden. Statt der Chloride sind auch Sulfate, Nitrate, Phosphate, Carbonate oder Acetate als Anionen möglich. Bei der Verwendung von abdampfbaren Salzen wie Ammoniumacetat lassen sich durch eine Gefriertrocknung des Eluats salzfreie Nukleinsäurepräparate gewinnen.

Zur Trennung eines Nukleinsäuregemisches erfolgt die Elution vorzugsweise so, daß ein Gradient, eine Mischung aus Bindungspuffer und Elutionspuffer mit kontinuierlich oder schrittweisem von 0% bis 100% ansteigendem Anteil an Elutionspuffer, durch die Säule gepumpt wird.

Das erfindungsgemäße Trennmateriale zeichnet sich durch ein hohes Bindungsvermögen gegenüber Nukleinsäuren aus. Beispielsweise besitzt Silicagel Si 300® mit 1,10-Diaza-18-Krone-6-Liganden ein Bindungsvermögen von 25mg E. coli 5S rRNA pro g Trockengewicht.

Beispiele

1. Beispiele für die Herstellung des erfindungsgemäßen Trennmateri- als.

Beispiel 1.1.

300 mg Diaza[2,2]-18-Krone-6 (Kryptofix®, Fa. Merck) wurde in 20 ml wässrigem (10%) Ethanol gelöst und nach Zugabe von 500 mg Eupergit® C (Fa. Röhm) über Nacht bei 50°C geschüttelt. Nach dem Abkühlen wurde das Produkt über einer Fritte abgesaugt und mehrfach mit Aceton gewaschen. Aus der Waschlösung konnte nach dem Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer etwa 280 mg ungebundener Kronenether zurückgewonnen werden.

Das Produkt wurde im Vakuumexsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und zur Durchführung der Bindungsexperimente in eine kleine Polystyrol-Chromatographiesäule (Fa. Pierce) gefüllt und 24 h mit Bindungspuffer (50 mM KCl, 5mM Tris · HCl, pH = 7,6) äquili- briert.

Beispiel 1.2.

Kieselgel Si 300 (Fa. Serva) wurde analog der Vorschrift von P.O. Larsson (Methods Enzymol. 104 (1984), 212—232) mit T-Glycidioxypropyl-trimethoxysilan in trockenem Toluol zu dem Epoxiderivat umgesetzt. 1 g des so hergestellten Epoxy-silicagels wurde zu einer Lösung von 300 mg Diaza-18-Krone-6 (Kryptofix® Fa. Merck) in 40 ml wässrigem (10%) Ethanol gegeben und über Nacht bei 50°C geschüttelt. Nach dem Abkühlen wurde das Produkt über einer Fritte abgesaugt und mit wenig Ethanol gewaschen. Aus der Waschlösung konnten nach dem Abziehen des Lösungsmittels 30 mg des ungebundenen Kronenethers zurückgewonnen werden. Das Produkt wurde im Vakuumexsikkator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und zur Durchführung der Bindungsexperimente in eine kleine Polystyrol-Chromatographiesäule (Fa. Pierce) gefüllt und 24 h mit Bindungspuffer (50mM KCl, 5mM Tris · HCl, pH = 7,6) äquili- briert.

2. Beispiele für die Anwendung des erfindungsgemäßen Trennmateri- als.

Beispiel 2.1

Die nach Beispiel 1.1 hergestellte Chromatographiesäule wurde mit 2 ml einer Lösung von 100 A₂₆₀-Einheiten Ecoli 5S rRNA in Bindungspuffer versetzt, verschlossen, und in einer Drehvorrichtung 2 bei 4°C rotiert. Danach wurde die Säule zur Entfernung eventuell nicht gebundener Nukleinsäure mit 5 ml Bindungspuffer gewaschen und anschließend mit einem linearen Gradienten aus A: Bindungspuffer und B: Elutionspuffer (1M NaCl) eluiert. Abb. 1 zeigt das Elutionsprofil der 5S rRNA.

Beispiel 2.2

Durch eine nach Beispiel 2.1 hergestellte Chromatographiesäule wurden 6 ml einer Lösung gepumpt, die 20 A₂₆₀-Einheiten eines t-RNA- und E. coli 5SrRNA-Gemisches in Bindungspuffer enthielt. Danach wurde die Säule zur Entfernung eventuell nicht gebundener Nukleinsäure mit 5 ml Bindungspuffer, dann mit 5 ml H₂O gewa- schen und anschließend mit einem linearen Gradienten aus A: H₂O und B: 2M Ammoniumacetat eluiert. Abb. 2 zeigt das Elutionsprofil und die Auftrennung der Nukleinsäuren in einen t-RNA- und 5S rRNA-Peak. Aus den entsprechenden Fraktionen konnten durch Lyophilisierung die salzfreien Nukleinsäuren gewonnen werden.

3644346

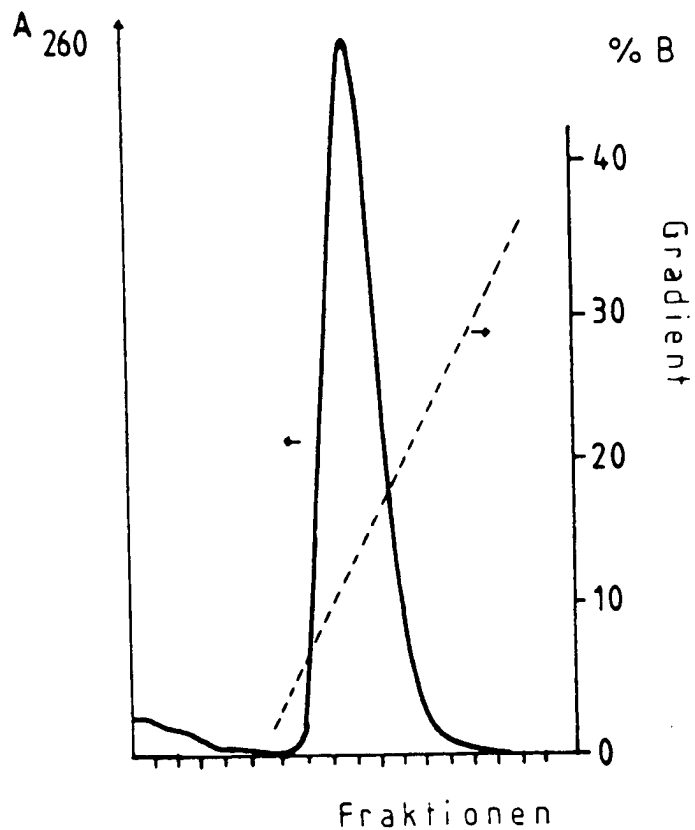
Nr.: 36 44 346

Cl. 4: B 01 J 20/26

Anmeldetag: 19. Dezember 1986

Offenlegungstag: 21. Mai 1987

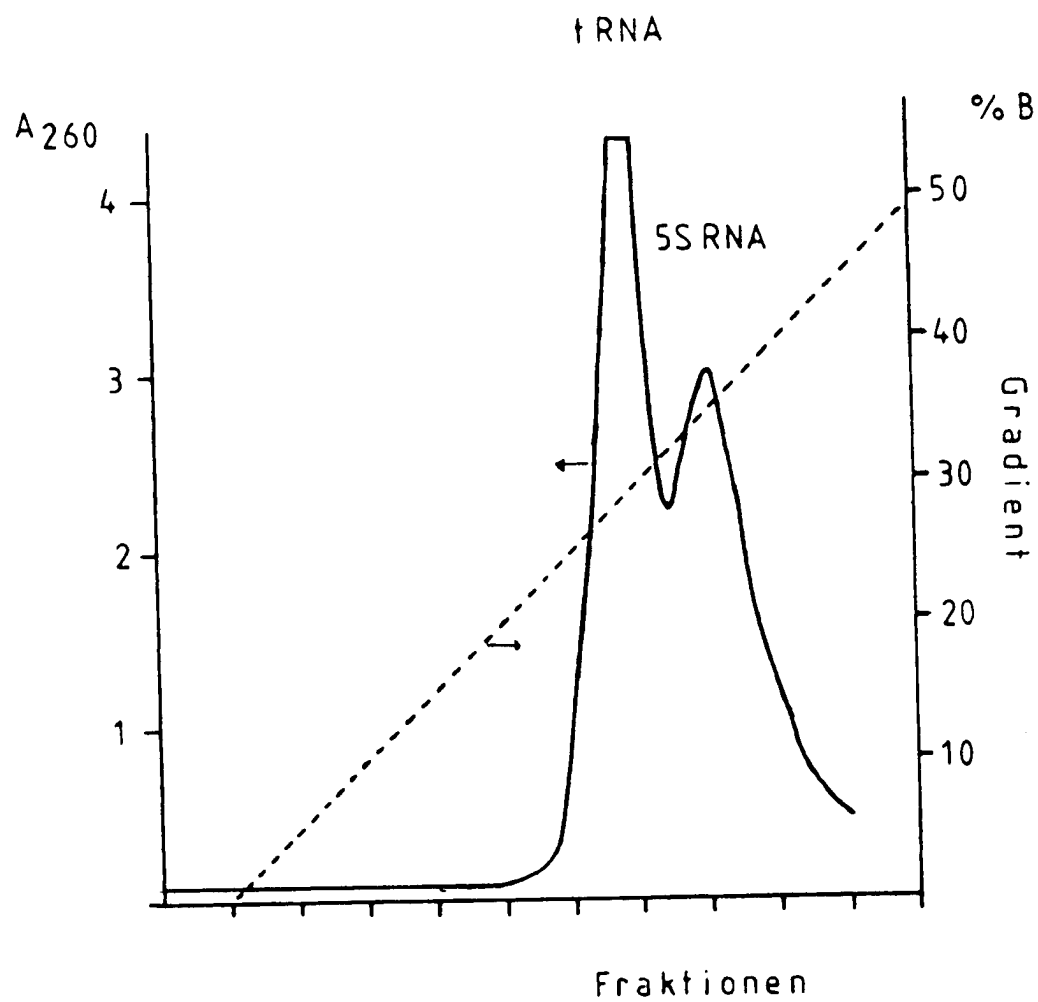
Abbildung 1



Gradient: A: Bindungspuffer
B: 1M NaCl

3644346

Abbildung 2



Gradient: A: H₂O
B: 2M Na-Acetat

ORIGINAL INSPECTED